

UJI PATOGENISITAS *Vibrio harveyi* PADA LARVA UDANG WINDU MENGUNAKAN RESISTEN RIFAMPISIN SEBAGAI PENANDA MOLEKULER

Pathogenicity Assay of *Vibrio harveyi* in Tiger Shrimp Larvae Employing Rifampicin-Resistant as a Molecular Marker

Widanarni¹⁾, D. Meha¹⁾, S. Nuryati¹⁾, Sukenda¹⁾ & A. Suwanto²⁾

¹⁾ Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor (16680)

²⁾ Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

ABSTRACT

Rifampicin-resistant marker was employed as a reporter to assay pathogenicity of *Vibrio harveyi* in shrimp larvae. *V. harveyi* M. G₃ and G₇ that difference *Noll* schizotyping as shown by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) used in this study. Spontaneous mutation was conducted to generate *V. harveyi* resistant to rifampicin. Two groups of shrimp post-larvae (PL₅) were immersed for 30 min in 10⁶ CFU/ml of mutants and wild type of *V. harveyi*, respectively; and then placed in a 2 liter shrimp rearing tank for five days. A control group was immersed in sterile seawater. Growth curve analysis and pathogenicity assay of *V. harveyi* showed that each of the *V. harveyi* mutant exhibited almost identical profiles to that of the wild type parental strain and did not show alteration in their pathogenicity. Samples from dead shrimp larvae showed that the dead shrimp larvae were infected by *V. harveyi* Rf^R. indicated that rifampicin-resistant marker effective as a reporter to assay pathogenicity of *Vibrio harveyi* in shrimp larvae.

Key words: Shrimp larvae. *Vibrio harveyi*, rifampicin-resistant. molecular marker

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji patogenesis *Vibrio harveyi* pada larva udang windu dengan menggunakan penanda resisten rifampisin (Rf^R) sebagai pelapor. Tiga galur *V. harveyi* yang berbeda berdasarkan *schizotyping NotI* yaitu galur G₃, G₇, dan MR5339 digunakan dalam penelitian ini. Pembuatan *V. harveyi* Rf^R dilakukan melalui mutasi spontan dengan menumbuhkan *V. harveyi* sensitif rifampisin pada media SWC-agar yang mengandung rifampisin 50 ug/ml. Uji patogenesis dilakukan melalui perendaman dengan konsentrasi *V. harveyi* Rf^R dan tipe liarnya masing-masing 10⁶ CFU/ml. Pada akhir percobaan dihitung kelangsungan hidup larva udang dan dibandingkan dengan kontrol, yakni perlakuan tanpa penambahan *V. harveyi*. Morfologi koloni *V. harveyi* Rf^R maupun pendarannya sama seperti tipe liarnya, demikian juga pertumbuhan dan patogenesisnya, sehingga penanda resisten rifampisin efektif digunakan sebagai penanda pada *V. harveyi* untuk membedakan dengan *Vibrio* yang secara alami ada pada larva udang.

Kata kunci: Larva udang. *Vibrio harveyi*, resisten-rifampisin, penanda molekuler

PENDAHULUAN

Udang windu (*Penaeus monodon*), merupakan salah satu komoditas ekspor unggulan hasil perikanan. Namun demikian, berbagai masalah seperti serangan penyakit dan penurunan kualitas lingkungan budidaya masih merupakan kendala utama dalam usaha budidaya udang windu. Serangan penyakit bakterial pada tingkat pembenihan yang paling serius dan sering menyebabkan terjadinya kematian massal pada larva udang windu adalah serangan bakteri berpendar yang diidentifikasi sebagai *Vibrio harveyi* (Lavilla-Pitogo *et al.* 1990; Karunasagar *et al.* 1994; Ruangpan *et al.* 1998). Bakteri ini pada umumnya menyerang larva udang pada stadia zoea, mysis dan awal pasca larva (Lavilla-Pitogo *et al.* 1990), sehingga merupakan kendala dalam penyediaan benih yang sehat dalam jumlah besar yang diperiukan untuk produksi udang windu.

Menurut Lavilla-Pitogo *et al.* (1990), pada umumnya *V. harveyi* bersifat patogen oportunistik, yaitu organisme yang dalam keadaan normal ada dalam lingkungan pemeliharaan dan berkembang dari sifat saprofitik menjadi patogenik apabila kondisi lingkungan dan inang memburuk. Saulnier *et al.* (2000) menyatakan bahwa beberapa galur *V. harveyi* merupakan patogen sebenarnya dan penyebab utama penyakit vibriosis pada udang windu. Untuk menguji sifat patogen *V. harveyi* terhadap larva udang windu dibutuhkan suatu metode khusus yang dapat mendeteksi kehadiran *V. harveyi* yang berasal dari isolat yang diujikan. Oleh karena itu *V. harveyi* yang akan diujikan pada larva udang perlu diberi penanda (*marker*) sebagai pelapor yang dapat mendeteksi keberadaan *Vibrio* tersebut. Selain itu, karena larva udang bebas *Vibrio* tidak tersedia (Widanarni & Suwanto 2000) maka *Vibrio* berpenanda tersebut dapat dibedakan dengan *Vibrio* lain yang secara alami telah ada pada larva udang dan media pemeliharaannya.

Penanda resisten terhadap antibiotik rifampisin menjadi pilihan yang dapat digunakan untuk *V. harveyi* karena pada umumnya *Vibrio* tersebut sensitif terhadap antibiotik rifampisin (Tjahyadi *et al.* 1994). Selain itu hasil mutasi spontan terhadap antibiotik rifampisin bersifat stabil sehingga dapat digunakan untuk ujiantang dalam jangka waktu lama. Penelitian ini bertujuan untuk menguji patogenisitas beberapa galur *V. harveyi* pada larva udang windu menggunakan penanda resisten rifampisin sebagai pelapor.

BAHAN DAN METODE

Karakterisasi Fisiologi dan Genetik Isolat *V. harveyi*

V. harveyi yang digunakan: dalam penelitian ini adalah *V. harveyi* MR5339 yang merupakan koleksi dari Balai Penelitian Perikanan Pantai, Maros, Sulawesi Selatan serta G3 dan G7 yang merupakan koleksi dari Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol, Bali. Ketiga galur *V. harveyi* tersebut kemudian dikarakterisasi sifat fisiologi dan biokimianya menggunakan analisis fisiologis Micobact (Medvet Science, Australia) dan identifikasinya berdasarkan Bauman *et al.* (1994). Untuk memastikan bahwa ketiga galur *V. harveyi* tersebut berbeda dilakukan analisis profil DNA genom *V. harveyi* menggunakan *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) berdasarkan pemotongan dengan enzim restriksi *NotI* (Suwanto *et al.* 1998; Widanami & Suwanto 2000). Sebagai penanda ukuran molekul digunakan genom *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 yang dipotong dengan enzim restriksi *AseI* (Suwanto & Kaplan 1989).

Sensitivitas Isolat *V. harveyi* terhadap Antibiotik Rifampisin

Galur yang berbeda berdasarkan *schizotyping NotI* kemudian diuji sifat sensitivitasnya terhadap antibiotik rifampisin dengan cara menumbuhkan isolat-isolat tersebut pada media *seawater complete* (SWC-agar) (5 g bactopectone, 1 g yeast extract, 3 ml glycerol, 15 g agar, 750 ml air laut, dan 250 ml aquades) dengan suplementasi rifampisin 50 µg/ml. Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam, respon resistensi diketahui dengan mengamati tumbuhnya koloni pada media tersebut.

Pembuatan *V. harveyi* Resistan Rifampisin (Rf^R)

Pembuatan *V. harveyi* resisten rifampisin (Rf^R) dilakukan melalui mutasi spontan dengan menumbuhkan kurang lebih 10⁸ CFU/ml *V. harveyi* tipe liar sensitif rifampisin pada media SWC-agar yang mengandung rifampisin 50 µg/ml (SWC+Rf). Mutan yang diperoleh selanjutnya diuji pertumbuhan dan patogenisitasnya pada larva udang serta dibandingkan dengan tipe liarnya.

Pertumbuhan *V. harveyi* Resistan Rifampisin (Rf^R)

Pertumbuhan diuji dengan menumbuhkan *V. harveyi* Rf^R sebanyak 1% (v/v) pada media SWC-cair selama lima hari berturut-turut dan kepadatan sel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Pola pertumbuhan *V. harveyi* Rf^R dibandingkan dengan tipe liarnya.

Patogenisitas *V. harveyi* Resistan Rifampisin (Rf^R)

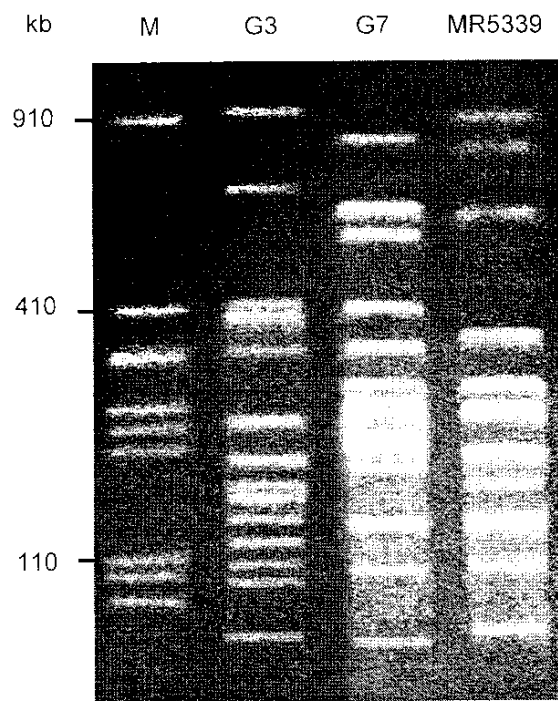
Pengujian dilakukan dengan merendam pasca larva udang windu stadia PL₅ pada suspensi *V. harveyi* Rf^R dan tipe liarnya, masing-masing dengan konsen-trasi 10⁶ CFU/ml selama 30 menit, dan selanjutnya dipelihara pada media pemeliharaan larva udang. Larva udang dipelihara dalam toples yang diisi air laut steril 2 liter dengan kepadatan 10 ekor/l dan diberi pakan *Artemia* 2-3 individu/ml. Pemeliharaan larva udang dilakukan selama 5 hari dan larva yang mati diamati setiap 6 jam. Larva yang mati selanjutnya digerus dan digores pada media SWC+Rf (reisolasi) untuk memastikan bahwa larva mati karena infeksi *V. harveyi* yang diujikan. Pada akhir percobaan dihitung kelangsungan hidup larva udang dan dibandingkan dengan kontrol, yakni perlakuan tanpa penambahan *V. harveyi*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Fisiologi dan Genetik Isolat *V. harveyi*

Koloni ketiga isolat *V. harveyi* yang digunakan berwarna hijau pada media selektif TCBS-agar dan berpendar jika diamati pada ruang gelap. Kemampuan berpendar merupakan hasil aktivitas enzim luciferase yang dapat berfungsi sebagai katalisator dalam proses oksidasi reduksi. Proses oksidasi melibatkan flavin mononukleotida dan aldehyd alifatik rantai panjang sebagai substratnya. Senyawa-senyawa tersebut masing-masing diubah menjadi flavin mononukleotida dan asam lemak disertai dengan pelepasan emisi cahaya dengan panjang gelombang sekitar 490 nm. Gen-gen yang mengkodekan fungsi perpendaran ini disandikan dalam suatu operon yang disebut dengan operon *lux* (Meighen 1991; Ruby 1996).

Hasil karakterisasi fisiologi dan biokimia menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut adalah *V. harveyi*. Beberapa karakter morfologi dan fisiologi ketiga isolat tersebut adalah bakteri Gram negatif, bersifat motil, berbentuk batang pendek, oksidase positif, tidak membentuk gas dari fermentasi terhadap D-glukosa, tidak memproduksi HLS, dapat menggunakan gelatin, glukosa dan laktosa sebagai sumber karbon tetapi tidak dapat menggunakan sukrosa, menghasilkan enzim protease, amilase, dan kitinase.



Gambar 1. Profil DNA genom *V. harveyi* G3, G7, dan MR5339 berdasarkan hasil pemotongan dengan enzim restriksi *NotI*. M adalah DNA genom *R. sphaeroides* 2.4.1 yang dipotong dengan enzim restriksi *AseI* sebagai marker.

Walaupun hasil karakterisasi fisiologi menunjuk-kan bahwa ketiga galur sama, namun secara genetik berbeda berdasarkan *schizotyping NotI* (Gambar 1). Pada Gambar 1 tersebut terlihat bahwa profil DNA genom *V. harveyi* MR5339, G3 dan G7 berbeda berdasarkan pemotongan dengan enzim restriksi *NotI*. Hasil penelitian Suwanto *et al.* (1998) menunjukkan bahwa galur *V. harveyi* berpendar yang menyerang larva udang sangat bervariasi pada musim dan lokasi yang berbeda, sehingga tidak semua spesies *Vibrio* penyebab penyakit vibriosis dapat dikendalikan dengan menggunakan vaksin karena sulit menentukan galur yang tepat sebagai bahan vaksin.

Sensitivitas *Vibrio* terhadap Antibiotik Rifampisin

Hasil uji sensitivitas semua galur *V. harveyi* terhadap antibiotik rifampisin menunjukkan bahwa semua isolat sensitif terhadap antibiotik tersebut. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Tjahjadi *et al.* (1994), yang menyatakan bahwa bakteri yang diisolasi dari air laut dan lingkungan pembenihan udang windu di daerah Kalianget, Jawa Timur, termasuk *V. harveyi*, resisten terhadap hampir semua jenis antibiotik kecuali rifampisin. Rifampisin adalah antibiotik bakterisidal yang bekerja dengan menghambat sintesis mRNA pada proses transkripsi. Antibiotik tersebut efektif untuk bakteri gram positif dan beberapa gram negatif dan sejauh ini tidak pernah digunakan di lingkungan pembenihan udang windu.

Pembuatan *V. harveyi* Resistan Rifampisin (R_i^{*1})

Dengan menumbuhkan kurang lebih 10^8 CFU/ml *V. harveyi* tipe liar sensitif rifampisin pada media SWC+Rf, diperoleh mutan resisten rifampisin sebanyak 50-60 koloni. Morfologi koloni mutan maupun pendarannya sama seperti tipe liarnya. Mutan tersebut selanjutnya diuji pertumbuhan dan patogenisitasnya pada larva udang windu.

Pertumbuhan dan Patogenisitas *V. harveyi* Resistan Rifampisin (R_f^R)

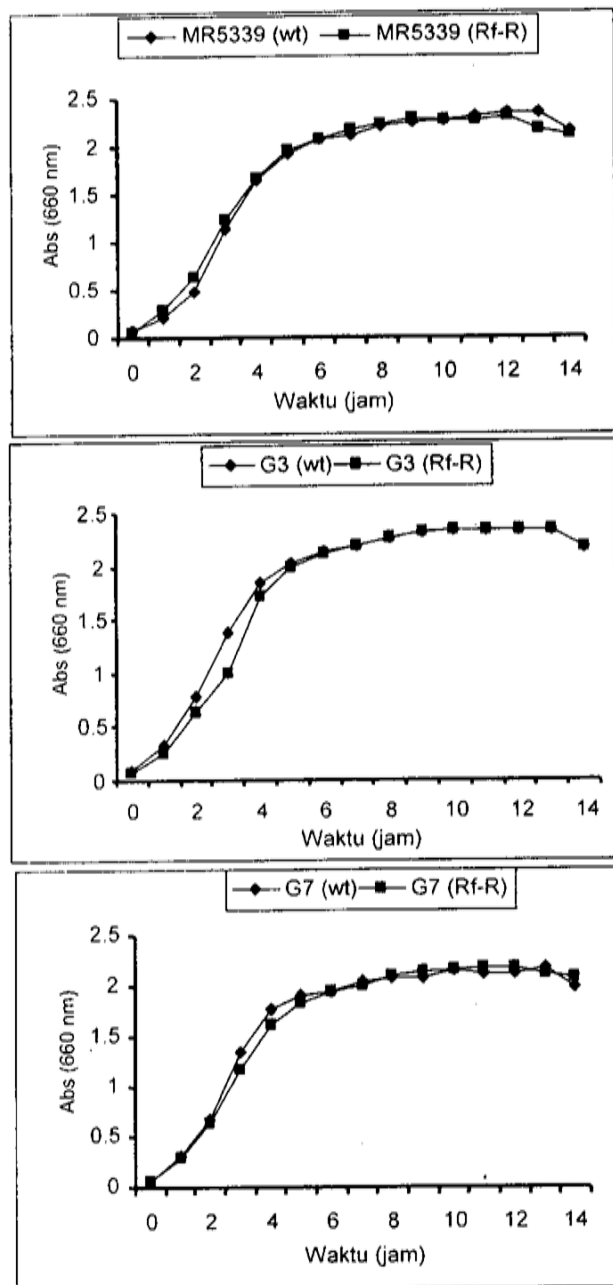
Untuk mengetahui pengaruh terjadinya mutasi resisten rifampisin terhadap pertumbuhan *V. harveyi*, maka pola pertumbuhan sel *V. harveyi* R_f^R dibandingkan dengan tipe liarnya. Namun hasil pengamatan menunjukkan bahwa kurva pertumbuhan *V. harveyi* R_f^R dan tipe liarnya memiliki pola yang identik (Gambar 2). Hal ini mengindikasikan bahwa mutasi yang terjadi tidak menyebabkan gangguan pada pertumbuhan sel *V. harveyi*.

Menurut Herrera *et al.* (2003), resistensi terhadap antibiotik rifampisin terjadi karena adanya perubahan sub unit b-RNA polimerase yang dikode oleh gen *rpo B*. Penelitian Herrera *et al.* (2003) menggunakan 169 isolat *Mycobacterium tuberculosis* resisten rifampisin menunjukkan bahwa 95,3% galur resisten rifampisin karena adanya mutasi pada daerah 81- β p dari gen *rpo B*, sedangkan 4,7% tidak terdeteksi adanya mutasi pada daerah tersebut, diduga strain tersebut menggunakan mekanisme resistensi yang belum diketahui. Lebih jauh juga dijelaskan bahwa mutasi pada daerah 81- β p dapat terjadi karena adanya perubahan satu, dua, atau tiga nukleotida, atau karena terjadi delesi dan insersi.

Hasil uji patogenisitas *V. harveyi* R_f^R pada larva udang juga menunjukkan bahwa terjadinya mutasi resisten rifampisin tersebut tidak berpengaruh nyata terhadap patogenisitas *V. harveyi*. Mortalitas larva udang windu setelah diinfeksi *V. harveyi* MR5339, G3, dan G7 sama antara tipe liar dan mutannya (Tabel 1). Hasil pengamatan larva udang yang mati setelah diinfeksi *V. harveyi* R_f^R menggunakan media SWC+Rf, menunjukkan larva mati karena infeksi *V. harveyi* uji. Keberadaan *V. harveyi* tersebut dapat dimonitor pada larva udang karena adanya penanda R_f^R yang diberikan pada *V. harveyi*. Dengan demikian penanda R_f^R efektif digunakan sebagai penanda molekuler pada *V. harveyi* sehingga dapat dibedakan dengan *Vibrio* yang secara alami ada pada larva udang. Penanda R_f^R juga efektif digunakan untuk penapisan (*screening*) bakteri kan-didat probiotik untuk larva udang windu, baik dalam uji *in vitro* maupun *in vivo* (Widanarni *et al.* 2003).

KESIMPULAN

Semua isolat *V. harveyi* yang diuji bersifat sensitif terhadap antibiotik rifampisin. Pertumbuhan dan



Gambar 2. Perbandingan pertumbuhan *V. harveyi* Rf^R dan tipe liarnya (wt).

Tabel 1. Patogenisitas *V. harveyi* Rf^R dan tipe liarnya.

Strain <i>V. harveyi</i>	Jumlah larva awal	Jumlah larva mati	Mortalitas (%)
MR5339 (wt)	20	9	45
MR5339 Rf ^R	20	9	45
G3 (wt)	20	9	45
G3 Rf ^R	20	9	45
G7 (wt)	20	10	50
G7 Rf ^R	20	10	50
Kontrol	20	2	10

patogenisitas *V. harveyi* Rf^R identik dengan tipe liarnya sehingga resisten rifampisin efektif digunakan sebagai penanda pada *V. harveyi* untuk membedakan dengan *Vibrio* yang secara alami ada pada larva udang windu.

DAFTAR PUSTAKA

- Baumann P., A.L. Furniss & J.V. Lee. 1994. Facultative anaerobic gram negative rods, p: 175-289. In: J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley & ST. Wilkins (Eds.). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. Baltimore: The Williams and Wilkins.
- Herrera L., S. Jimenez, A. Valverde, M.A. Garcia-Aranda & A. Saez-Nieto. 2003. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996-2001). Description of new mutations in the *rpo B* gene and review of the literature. Int. J. Antimicrob. Agents., 21:403-408.
- Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathi & I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 128: 203-209.
- Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda & L.D. De la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial diseases of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture, 91: 1-13.
- Meighen E.A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. Microbiol Rev., 55: 123-142.
- Ruangpan L. 1998. Luminous bacteria associated with shrimp mortality, p: 205-211. In: T.W. Flegel (Ed.). Advances in Shrimp Biotechnology. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology, 5th Asian Fisheries Forum; Chiangmai, Thailand. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
- Ruby E.G. 1996. Lessons from a cooperative bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* light organ symbiosis. Annu. Rev. Microbiol., 50:591-624.
- Saulnier D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy & D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture, 191: 133-144.
- Suwanto A. & S. Kaplan. 1989. Physical and genetic mapping of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: genome size, fragment identification and gene localization. J. Bacteriol, 171: 5840-5849.

- Suwanto A., M. Yuhana, E. Herawaty & S.L. Angka. 1998. Genetic diversity of luminous *Vibrio* isolated from shrimp larvae J. p: 217-224. *In*: T.W. Flegel (Ed.). Advances in Shrimp Biotechnology. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology, 5th Asian Fisheries Forum; Chiangmai, Thailand, Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
- Tjahjadi, M.R., S.L. Angka & A. Suwanto. 1994. Isolation and evaluation of marine bacteria for biocontrol of luminous bacterial diseases in tiger shrimp larvae (*Penaeus monodon* Fab.). *Aspac. J. Mol. Biol. Biotechnol*, 2: 234-352.
- Widanarni & A. Suwanto. 2000. Genetic diversity of ampicillin resistant *Vibrio* isolated from various stages of shrimp larvae development. *Biotropia*, 15: 36-47.
- Widanarni, A. Suwanto, Sukenda & B.W. Lay. 2003. Potency of *Vibrio* isolates for biocontrol of vibriosis in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) larvae. *Biotropia*, 20: 11-23.